

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 29 日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/090565 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q 1/68, G01N 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005612
- (22) 国際出願日: 2005 年 3 月 18 日 (18.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-081034 2004 年 3 月 19 日 (19.03.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋紡績株式会社 (TOYOBO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒530-8230 大阪府 大阪市 北区堂島浜二丁目 2 番 8 号 Osaka (JP). 日本碍子株式会社 (NGK INSULATORS, LTD.) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町 2-5 6 Aichi (JP).

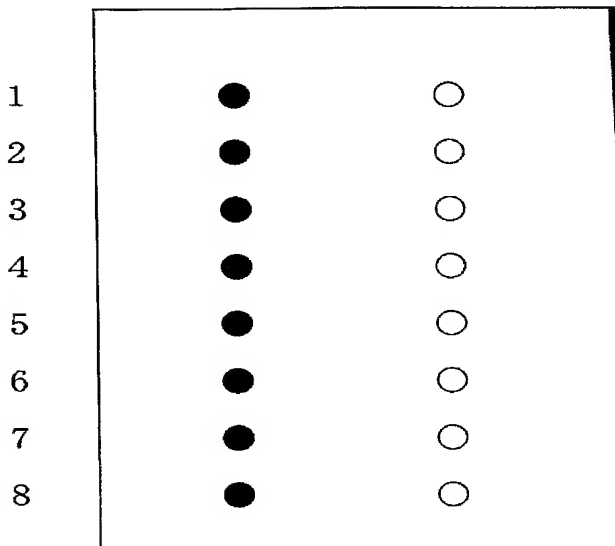
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 川瀬 三雄 (KAWASE, Mitsuo) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町 2-5 6 日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 吉田 安子 (YOSHIDA, Yasuko) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町 2-5 6 日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 山田 和成 (YAMADA, Kazunari) [JP/JP]; 〒467-8530 愛知県 名古屋市 瑞穂区須田町 2-5 6 日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 宝田 裕 (TAKARADA, Yutaka) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀市 東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP). 橋本 幸蔵 (HASHIMOTO, Kouzo) [JP/JP]; 〒530-8230 大阪府 大阪市 北区堂島浜二丁目 2 番 8 号 東洋紡績株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都 港区 南青山 6 丁目 1 1 番 1 号 スリーエフ南青山ビルディング 7 F Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: DNA ARRAY AND METHOD OF DETECTING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

(54) 発明の名称: DNAアレイと一塩基多型の検出方法

A 第 1 プローブ スポット B 第 2 プローブ スポット



A FIRST PROBE SPOT
B SECOND PROBE SPOT

(57) Abstract: A DNA array for detecting a single nucleotide polymorphism (SNP) in a gene having first probe spots, which comprise one or more spots wherein a sequence part hybridizable with a gene polynucleotide is exactly complementary to a first polymorphism mode of the gene, and second probe spots, which comprise one or more spots wherein the sequence part is exactly complementary to a second polymorphism mode of the gene, on a solid support. The probe spots constituting the first probe spots and the second probe spots differ in length from spot to spot. This DNA array makes it possible to more exactly detect an SNP.

(57) 要約: 遺伝子の一塩基多型を検出するための DNAアレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第1の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第1のプローブスポット群と、同配列部分が遺伝子の第2の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第2のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第1プローブスポット群と第2プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブスポット毎にプローブの長さが異なる。このDNAアレイは、より正確なSNP検出を可能とする。

WO 2005/090565 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,

BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

DNA アレイと一塩基多型の検出方法

5

技術分野

この出願の発明は DNA アレイと一塩基多型の検出方法に関するものである。
さらに詳しくは、この出願の発明は、一塩基多型をより正確に検出することので
10 きる DNA アレイと、この DNA アレイを用いた一塩基多型の検出方法に関する
ものである。

背景技術

15

ポストゲノムの時代を迎え、ヌクレオチド配列中の塩基種を正確に、効率よく、
さらには低コストで検出するための新しい技術が求められている。例えば、SNP
(Single Nucleotide Polymorphism:一塩基多型)はヒトゲノムに約 0.1% (約
1000 塩基に一塩基)の割合で存在する最も頻度の高い多型である。すなわち、
20 この一塩基多型とは、ゲノム遺伝子の一塩基が他の塩基に置換することによって、
例えば野生型が G-C 塩基対であるのに対し、多型形態では A-T 塩基対となっ
ている状態を意味する。また二媒体染色体のそれぞれの対立遺伝子が多型形態で
ある場合 (ホモ接合型多型形態)と、一方が野生型、他方が多型形態である場合
(ヘテロ接合型多型形態)とが存在する。

25

このような一塩基の変異は、例えばコドン変異による変異アミノ酸の合成 (ミ
スセンス変異)や終止コドンの生成による不完全タンパク質の合成 (ナンセンス
変異)を生じさせる場合がある。従って、SNP の有無が様々な疾病にも関連す
ることが明らかになりつつあり (例えば肺癌に関する p53 遺伝子の SNP : 非特
30 許文献 1)、診断や遺伝的治療法等を目的として SNP の有無を正確に判定する

こと（SNP タイピング）の重要性が強く認識されてきている。また、この SNP は疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーでもあり、テーラーメイド医療のための重要な遺伝子情報としても注目されている。

5

SNP タイピングの方法としては、「ハイブリダイゼーション効率を利用した方法」、「酵素認識効率を利用した方法」、「電気的手法を利用した方法」等が知られているが、特にハイブリダイゼーション効率を利用した方法は、DNA アレイ（例えば特許文献 1-4、非特許文献 2、3 参照）への適用が様々に検討されて
10 しており、例えば非特許文献 4 には DNA アレイを用いた BRCA1 遺伝子 SNP の検出例が報告されている。

この SNP 検出用の DNA アレイは、例えば、標的遺伝子の野性型配列に相補的な第 1 プロブスポットと、その遺伝子の一塩基多型配列に相補的な第 2
15 プロブスポットとを固相基体上に配置している。そして、SNP の検出に当たっては、蛍光標識プライマーを用いた PCR 増幅等の手段によって調製された標的遺伝子 cDNA をこの DNA アレイに接触させる。標的遺伝子が野性型の場合、その標識 cDNA は第 1 プロブにハイブリダイズし、第 1 プロブのスポットからのみ蛍光シグナルが得られる（ホモ接合型野性型形態）。一方、標的遺伝子の
20 両方の対立遺伝子が SNP の場合には、第 2 プロブスポットのみから蛍光シグナルが得られ（ホモ接合型 SNP 形態）、一方の対立遺伝子が SNP の場合には、第 1 プロブスポットと第 2 プロブスポットとの両方に同程度の蛍光シグナルがえられる（ヘテロ接合型 SNP 形態）。

25 特許文献 1： 米国特許第 5,474,796 号明細書

特許文献 2： 米国特許第 5,605,662 号明細書

特許文献 3： 国際公開第 95/251116 号パンフレット

特許文献 4： 国際公開第 95/35505 号パンフレット

非特許文献 1： Biros et al. Neoplasma 48(5):407-11, 2001

30 非特許文献 2： Schena, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10614-

10619, 1996

非特許文献 3 : Heller, R. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155, 1997

非特許文献 4 : Hacia JG et al. Nat. Genet. 14:441-447, 1996

5

発明の開示

DNA アレイを用いた SNP 検出では、それぞれのプローブスポットの蛍光シグナルを指標として明確に野性型形態、ホモ接合型 SNP 形態、ヘテロ接合型 SNP 形態を区別することは容易ではない。すなわち、野性型遺伝子と多型遺伝子のそれぞれに由来する標識 cDNA は一塩基のみの違いである。従って、野性型 cDNA の多くはそれに完全に相補的な野性型プローブ（第 1 プローブ）にハイブリダイズするが、一部は一塩基が異なる第 2 プローブにもハイブリダイズする。同様に多型 cDNA も一部は第 1 プローブにもハイブリダイズする。そこで DNA アレイによる SNP 検出は、第 1 プローブスポットと第 2 プローブスポットのそれぞれの蛍光シグナルを比較することによって行われるが、両者のシグナル強度の比較が困難な場合があり、結果として誤った SNP 判定を行ってしまうという不都合が存在した。

20

そこでこの出願の発明は、より正確な SNP 検出を可能とする DNA アレイと、この DNA アレイを用いた SNP 検出方法を提供することを課題としている。

さらにこの出願の発明は、DNA アレイを用いた SNP 検出において、より正確な検出を可能とするプローブ長を決定する方法と、この方法により決定された特定長のプローブを備えた DNA アレイを提供することを課題としている。

この出願の発明者らは、SNP 検出の対象となる被験遺伝子毎に、SNP 形態を正確に判定するための最適標識シグナルを得ることのできるプローブ長が異なることを見出してこの発明を完成させた。

30

この出願は、前記の課題を解決するための第 1 の発明として、遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同配列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブスポット毎にプローブの長さが異なる、ことを特徴とする DNA アレイを提供する。

10

この第 1 発明の DNA アレイにおいては、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群は、それぞれ、2~10 のプローブスポットからなることを好ましい態様としている。

15

またこの第 1 発明の前記態様においては、2~10 のプローブスポットが、そのプローブの長さの順に配置されていることを好ましい態様としている。

この出願は、第 2 の発明として、前記第 1 発明の DNA アレイを少なくとも含む、遺伝子の一塩基多型を検出するためのキットを提供する。

20

この出願は、第 3 の発明として、前記第 1 発明の DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多型を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；

(b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ；

25 (c) DNA アレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定するステップ；

を含むことを特徴とする一塩基多型の検出方法を提供する。

この第 3 発明の方法においては、前記ステップ(c)において測定された、前記
30 第 1 のプローブスポット群と前記第 2 のプローブスポット群のそれぞれのシグ

ナルを比較することをさらに好ましい態様としている。

この出願は、第4の発明として、前記第1発明のDNAアレイを用いて、遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法であって、以下のステップ：

- (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；
- (b) 標識ポリヌクレオチドをDNAアレイに接触させるステップ；
- (c) DNAアレイ上の各プローブに結合した標識ポリヌクレオチドの標識シグナルを測定し、

以下の基準：

- (i) 被験遺伝子がホモ接合性第1多型形態の場合に第1のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
 - (ii) 被験遺伝子がホモ接合性第2多型形態の場合に第2のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
 - (iii) 被験遺伝子がヘテロ接合性多型形態の場合に第1のプローブスポット群と第2のプローブスポット群とに同程度の標識シグナルが観察されること、
- を満たすプローブスポットのプローブ長を、その遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長と決定することを特徴とする方法を提供する。

さらにこの出願は、第5の発明として、遺伝子の一塩基多型を検出するためのDNAアレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第1の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第1のプローブスポットと、同配列部分が遺伝子の第2の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第2のプローブスポットとを固相基体上に有し、第1および第2のプローブスポットを構成するプローブ長が、前記第4発明の方法で決定された長さであるDNAアレイを提供する。

第1発明のDNAアレイは、様々な1塩基多型形態に対してより正確にハイブリダイズすることのできる様々なプローブ長からなるプローブスポットを備えている。従って、この第1発明のDNAアレイを用いた第3発明の方法によって、

より正確な SNP 検出が可能となる。

また第 4 発明の方法によって、SNP 検出の対象となる遺伝子毎に適切なプローブ長が決定される。そして、この方法によって、各遺伝子の SNP 検出に適した
5 プローブ長からなるプローブスポットを含む第 5 発明の DNA アレイが提供される。

なおこの出願の発明において、「一塩基多型」とは例えば遺伝子データベース等に登録された遺伝子配列とは異なる一塩基変異を有する場合を言う。従って、
10 データベース等に登録された遺伝子配列が必ずしも野性型（正常型）を意味するわけではなく、また一塩基変異を有する遺伝子に変異遺伝子であるわけでもない。ただし、一塩基の変異が疾患等に関連することが知られている遺伝子については、野性型を「正常型」、一塩基多型を「変異型」と定義することもできる。この出願の発明においては、従って、遺伝子の「第 1 の多型形態」と「第 2 の多型形
15 態」とは、基本的に「野性型」および「変異型」を意味するものではなく、以下の説明では、第 1 の多型形態はデータベース等に登録されている遺伝子配列の形態、第 2 の多型形態は第 1 多型形態の配列中の一塩基が他の塩基に置換した配列からなる形態と定義する。

20 この出願の発明における「遺伝子ポリヌクレオチド」とは、具体的には、SNP 検出の対象となる遺伝子のゲノム DNA、ゲノム DNA から転写された mRNA、または mRNA から合成された cDNA を意味する。またこのポリヌクレオチドは、複数のヌクレオチド、好ましくは 30 以上、より好ましくは 50 以上のヌクレオチドが結合した分子である。

25 この出願の各発明における具体的構成は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく説明する。またこの発明に係る用語や概念は、特別に規定したものを除き、当該技術分野において通常使用されている範囲のものである。さらにこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除
30 いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。

例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

図面の簡単な説明

10 図 1 は、この発明の DNA アレイの構成例を示した模式図である。

図 2 はこの発明の DNA アレイの別の構成例を示した模式図である。

15 図 3 は、この発明の DNA アレイを用いて遺伝子 GNB3 の SNP を検出した例を示した蛍光画像である。

図 4 は、この発明の DNA アレイを用いて遺伝子 MTHFR の SNP を検出した例を示した蛍光画像である。

20 図 5 は、この発明の DNA アレイを用いて遺伝子 CYP 2C19-2 および CYP 2C19-3 のそれぞれの SNP を検出した例を示した蛍光画像である。

発明を実施するための最良の形態

25

第 1 発明の DNA アレイは、1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同じく 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有している。第 1 のプローブスポット群を構成する各プローブは、解析対象となる遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が、同遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的であり、第 2 のプローブスポット群を構成

30

する各プローブは、同遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が、同遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である。そして、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、それぞれ長さの異なるプローブによって構成されている。

5

さらに詳しくは、「プローブスポット」とは、1 以上、好ましくは $10^3 \sim 10^{13}$ 個の同一プローブ（同一配列、同一長のプローブ）の集団が他のプローブスポットと分離されて存在する領域を言う。「プローブスポット群」とは、同一配列で、かつ長さの異なるプローブからなるプローブスポットの集団を意味する。この集団は、一つの好ましい態様として、2~10 のプローブスポットからなる集団である。またこれらのプローブスポットは、それを構成するプローブの長さの順に整列配置されていることを好ましい態様としている。以下、このように整列配置されているプローブスポット群を「プローブスポット列」と記載することがある。さらに、第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列は、互いに同一プローブ長からなるプローブスポットが相対向してもよい。

10

15

20

25

図 1 は、第 1 発明の DNA アレイの構成例である。この第 1 図の例では、第 1 プローブスポット（黒丸）の列と、第 2 プローブスポット（白丸）の列は、それぞれ 8 個のプローブスポットによって構成されている。また、各プローブスポットは、それぞれに含まれるプローブが長→短の順に 1~8 段目までに整列配置されている。すなわち、第 1 段目の第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列のそれぞれを構成するプローブは n 個のヌクレオチドであり (n mer)、以下第 2 段目スポットのプローブから順に、 $n-1$ mer、 $n-2$ mer、 $n-3$ mer、 $n-4$ mer、 $n-5$ mer、 $n-6$ mer、 $n-7$ mer である。この場合の「 n 」は 10~100 程度、好ましくは 20~50 程度である。

「長さの順番」は長→短の順番であってもよく、短→長の順番であってもよい。また、プローブ長の違いは 1 塩基ずつの違いでもよく、あるいは 2 または 3 塩基ずつの違いであってもよい。さらに、この図 1 の例では第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列のそれぞれのスポットを縦方向（上から下）に

30

配置しているが、横方向（右から左）に配置してもよい。

さらにまた、同一プローブ（同一配列、同一長のプローブ）からなるプローブスポット 2～5 個程度を整列配置するようにしてもよい。例えば、図 2 は、第 1
5 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列の各段には、同一プローブからなる 3 個のプローブスポットがそれぞれ並列配置されている。すなわち、同一プローブからなる複数個のプローブスポットの存在によって、個々のプローブスポットに含まれるプローブ数に若干の変動による影響を排除することができる。

10 第 1 発明の DNA アレイは、以上のとおりのプローブスポット群（好ましくはプローブスポット列）を配置することを除き、通常の DNA アレイと同様にして作製することができる。DNA アレイの作製方法としては、固相担体表面で直接プローブを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したプローブを固相基
15 体表面に固定する方法とが知られているが、この発明の DNA アレイは後者の方法で作製することが好ましい。予め調製したプローブを固相基体表面に固定する場合には、官能基を導入したプローブを合成し、表面処理した固相基体表面にプローブを点着し、共有結合させる（例えば、Lamture, J.B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）。プローブは、一般的には、表面処理した固相基体にスペーサーやクロ
20 スリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこにプローブを共有結合させる方法（Yershov, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4913, 1996）、あるいはポリ L-リジンを被覆した固相基体にプローブを結合する方法（特開 2001-186880 号公報）も知られている。また、シリカマイクロアレイ上に微小電極のアレイを作製し、電極上
25 にはストレプトアビジンを含むアガロースの浸透層を設けて反応部位とし、この部位をプラスに荷電させることでビオチン化プローブを固定し、部位の荷電を制御することで、高速で厳密なハイブリダイゼーションを可能にする方法も知られている（Sosnowski, R.G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1119-1123, 1997）。この発明の DNA アレイは、以上のいずれの方法によっても作製
30 することができる。また、プローブを固相基体表面に滴下させてスポットティングを行

う場合には、ピン方式（例えば米国特許第 5,807,5223 号）によって行うこともできるが、特開 2001-116750 号公報や特開 2001-186881 号公報に開示されているインクジェット方式を採用することが、均一で一定形状のスポット形成のために好ましい。また、このインクジェット方式では、個々のプローブスポット

5 に含まれるプローブ数を等しくすることができるため、プローブ長の違いによるハイブリダイゼーションの違いを正確に測定することができる。さらに、特開 2001-186880 号公報に開示されているような、スポットティング重ね打ちを行うこと、あるいは WO 03/038089 A1 号パンフレットに開示された組成からなる

10 プローブ溶液（保湿性物質を含む溶液）を使用することも、好ましいスポット形成のために推奨される。

スポットティングの後は、冷却、スポットに対する水分付加（湿度～80%程度に一定時間保持）、焼成乾燥による固定化処理等を行うことによって、各スポットを固相基体上に固定するし、DNA アレイを完成することができる。

15

なお、DNA アレイの固相基体は、通常の DNA アレイに使用されるガラス（スライドガラス）の他、プラスチック、シリコン、セラミック等を使用することもできる。

20

第 2 発明は、前記の DNA アレイを含むことを特徴とする一塩基多型検出用のキットである。このキットは、例えば、DNA アレイ、プライマー、PCR 緩衝液、dNTP、MgCl₂、Taq DNA ポリメラーゼ等によって構成することができる。

25

第 3 発明の方法は、前記第 1 発明の DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多型を検出する方法であって、以下のステップを必須として含むことを特徴としている。

- (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ。
 - (b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ。
 - (c) DNA アレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより
- 30 得られるシグナルを測定するステップ。

ステップ(a)における被験遺伝子は、SNP の存在が知られている遺伝子であり、その標識ポリヌクレオチドは、例えば既存の SNP データベース（例えば http://SNP.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html）等で公開されているプライマーセットを用いて、被験者から単離したゲノム遺伝子またはトータル RNA から

5 の PCR 産物（cDNA）として調製することができる。この PCR 増幅の際に、標識プライマー（例えばシアニン系有機色素；Cy3、Cy5などを結合したプライマー）を取り込ませて標識ポリヌクレオチドとする。

- 10 ステップ(b)では、標的ヌクレオチド配列を DNA アレイに接触させ、DNA アレイのプローブにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションは、96 穴もしくは 384 穴プラスチックプレートに分注した標識ポリヌクレオチド水性液を、DNA アレイ上に点着することによって実施することができる。点着の量は、1～100 nl 程度とすることができる。ハイブリダイゼーションは、室温～70℃の温
- 15 度範囲で、1～20 時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の標識ポリヌクレオチドを除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、
- 20 クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

そして、ステップ(c)において、プローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定する。そして、得られたシグナルから、例えば、以下のとおりに SNP を検出する。

25

まず、得られたシグナルのカットオフ値を 20,000 とし、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群の少なくともどちらか一方のシグナルが、20,000 以上の部分の第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のシグナル比（第 1/第 2）を算出し、

- 30 (1) シグナル比が>5 の時は被験遺伝子をホモ接合性第 1 多型形態と判定する。

- (2) シグナル比が <0.2 の時は被験遺伝子をホモ接合性第 2 多型形態と判定する。
- (3) さらに、シグナル比が 0.2 以上 5 以下の時は被験遺伝子をヘテロ接合性多型形態と判定する。

5

更に別の判定方法としては、図 1 に例示した DNA アレイを用いた場合に、第 1 プローブスポット列を構成する 8 個のスポット全てにシグナルが観察され、第 2 プローブスポット列を構成する 4 個のスポットにシグナルが観察された場合には、前記(1)に該当し、この被験遺伝子はホモ接合性第 1 多型形態と判定される。

10 あるいはまた、第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列のそれぞれから同数のシグナルスポットが得られた場合であっても、第 1 プローブスポット列のシグナルスポットのシグナル強度の総和が第 2 プローブスポット列のそれより多い場合には、前記(1)に該当し、この被験遺伝子はホモ接合性第 1 多型形態と判定される。

15

また前記(3)の判定基準は、シグナルスポットの数が同一であり、それぞれのシグナル強度の総和が 30%以下、好ましくは 20%以下、より好ましくは 10%以下である場合とすることもできる。

20 すなわち、従来方法では、それぞれ単一の第 1 プローブスポットと第 2 プローブスポットのシグナル強度の多寡を比較するのに対し、この第 3 発明の方法では、それぞれ複数個のスポットからなるプローブスポット群からより多くのシグナルを発するスポット数を測定し、それを比較する。これによって、従来方法に比べてはるかに高精度で SNP を検出することが可能となる。

25

なお、第 3 発明における標識ポリヌクレオチドの調製や、ハイブリダイゼーション手続等は、例えば特開 2001-095574 号公報を初め、多くの特許文献、非特許文献に記載されており、それらの文献記載の方法を適宜に採用して行うことができる。

30

第 4 発明の方法は、前記第 1 発明の DNA アレイを用いて、各遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法である。具体的には、前記第 3 発明の方法で SNP を検出する際に最も適したプローブ長、すなわち、それぞれの 1 塩基多型形態を最も正確に反映することのできるプローブ長が、この第 4 発明において決定されるプローブ長となる。従って、被験者の SNP 検出を目的とした第 3 発明の方法によって得られるデータから、適切なプローブ長を得ることができる。

そして、各遺伝子について適切なプローブ長からなるプローブスポットをそれぞれに備えた第 5 発明の DNA アレイが提供される。この第 5 発明の DNA アレイは、一つの被検遺伝子に対して、それぞれ「一つ」の第 1 プローブスポットと第 2 プローブスポットを備えている。それぞれのプローブスポットを構成するプローブは、その遺伝子の SNP を検出するための最適の長さである。従って、この第 5 発明の DNA アレイは、第 1 発明の DNA アレイと比較してはるかに多くの遺伝子の SNP 検出を対象とするプローブスポットを備えることができ、しかも SNP 検出制度は第 1 発明の DNA アレイと実質的に同一である。

実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例 1

(1) DNA アレイの作成

遺伝子 GNB3、MTHFR のそれぞれのポリヌクレオチド (cDNA) にハイブリダイズする配列部分がそれぞれの遺伝子の第 1 多型形態に正確に相補的である第 1 プローブ、同じく配列部分が第 2 多型形態に正確に相補的である第 2 プロ

ープを、それぞれ 1 塩基異なる長さで合成した。各プローブの塩基配列は、遺伝子 GNB3 用の第 1 プローブ (GNB3C-01~08) は SEQ ID No. 1-8、第 2 プローブ (GNB3T-01~08) は SEQ ID No. 9-16、遺伝子 MTHFR 用の第 1 プローブ (MTHFRC-01~08) は SEQ ID No. 17-24、第 2 プローブ (MTHFRT-01~08) は SEQ ID No. 25-32 である。また、SEQ ID Nos. 1-32 の各塩基配列の 5' 側には塩基配列「TTTTT」が連結されている。

これらのプローブの 5' をアミノ基で修飾し、オリゴ DNA 固定化用エポキシガラス基板に、1 スポット当たり、50pmol/ μ L の溶液を 200pL ずつスポッティングした。また、第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列の構成は、図 2 に示したように、同一プローブからなるプローブスポットを 3 個ずつ並列配置した。

スポッティング後、42℃、相対湿度 50% の条件下で一晩インキュベートした。次に、0.2% SDS 水溶液で室温にて 2 分間洗浄し、さらに滅菌水で室温にて 1 分間の洗浄を 2 回行った。最後に 50℃ の滅菌水中で 20 分間インキュベーション後、遠心器で 1000rpm \times 5 分間遠心し、乾燥した。

(2) 標識ポリヌクレオチドの調製

遺伝子型が判明している被験者血液から抽出した DNA をテンプレートとし、以下の PCR 条件で増幅を行い、標識ポリヌクレオチドを調製した。

・プライマー 1: 5pmol (5' 末端 Cy3 標識)

・プライマー 2: 5pmol

・ $\times 10$ 緩衝液: 2.5 μ l

・2 mM dNTP: 2.5 μ l

・25 mM MgCl₂: 2.5 μ l

・Taq DNA ポリメラーゼ: 1U

・抽出 DNA 溶液: 20 ng

・増幅条件

94℃ / 5 分

94℃ / 30 秒、60℃ / 30 秒、72℃ / 30 秒 (35 サイクル)

72℃ / 2 分

(3) ハイブリダイゼーション

前記(2)で調製した標識ポリヌクレオチドを 0.3 N NaOH (終濃度) と混合し、一本鎖に変性した後、200 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH6.0)、2% SDS、
5 750 mM NaCl、0.1% NaN₃ (全て終濃度) を添加、混合し、サンプルとした。

次に、前記(1)で作製した DNA アレイ上にハイブリダイゼーションサンプルを滴下し、カバーガラスをかけ、55℃、相対湿度 100% のモイスターチャンバー内で一晩インキュベートを行った。反応後、カバーガラスをはずし、あらかじめ 55℃ に加温した 2×SSC、1% SDS 水溶液に、55℃ で 20 分間浸漬した。

10 次に 50 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.025% Tween20 水溶液に 15 分間浸漬した後、遠心器で 1000 rpm で 5 分間遠心し、乾燥した。

(4) シグナル測定

Scan Array (Packard BioScience 社製) にて、レーザーパワー100%、フォトマル 100% で蛍光画像を測定した。得られた画像は図 3、4 に示したとおりである。また、得られた画像シグナルを GenePix Pro (Axon 社製) にて数値化した (表 1-3)。

20 蛍光シグナルのカットオフ値を 20,000 とし、第 1 プローブと第 2 プローブの少なくともどちらか一方の蛍光シグナルが 20,000 以上の部分の第 1 プローブと第 2 プローブの蛍光シグナル比 (第 1/第 2) を算出した。蛍光シグナル比が >5 の時はホモ接合型第 1 多型形態、<0.2 の時はホモ接合型第 2 多型形態、0.2 以上 5 以下の時はヘテロ接合性多型形態と判定したところ、事実と一致したことが確認できた。

表 1

プローブ名	シグナル平均値		プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	58708		GNB3T-01	53770
GNB3C-02	59917		GNB3T-02	61692
GNB3C-03	51209		GNB3T-03	62803
GNB3C-04	58654		GNB3T-04	26074
GNB3C-05	59910		GNB3T-05	12235
GNB3C-06	49292		GNB3T-06	4232
GNB3C-07	11455		GNB3T-07	287
GNB3C-08	7982		GNB3T-08	-
MTHFRC-01	52477		MTHFRT-01	49964
MTHFRC-02	28938		MTHFRT-02	37235
MTHFRC-03	24547		MTHFRT-03	682
MTHFRC-04	23134		MTHFRT-04	402
MTHFRC-05	19816		MTHFRT-05	1895
MTHFRC-06	9657		MTHFRT-06	540
MTHFRC-07	1103		MTHFRT-07	327
MTHFRC-08	-		MTHFRT-08	-

表 2

プローブ名	シグナル平均値		プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	43057		GNB3T-01	54237
GNB3C-02	48372		GNB3T-02	51780
GNB3C-03	49170		GNB3T-03	46744
GNB3C-04	46289		GNB3T-04	48697
GNB3C-05	39406		GNB3T-05	52358
GNB3C-06	35536		GNB3T-06	43055
GNB3C-07	6042		GNB3T-07	8489
GNB3C-08	2768		GNB3T-08	216
MTHFRC-01	63347		MTHFRT-01	53418
MTHFRC-02	54415		MTHFRT-02	59295
MTHFRC-03	43163		MTHFRT-03	15571
MTHFRC-04	28148		MTHFRT-04	16884
MTHFRC-05	24618		MTHFRT-05	25909
MTHFRC-06	9163		MTHFRT-06	8836
MTHFRC-07	2727		MTHFRT-07	-
MTHFRC-08	-		MTHFRT-08	-

表 3

プローブ名	シグナル平均値		プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	58342		GNB3T-01	61200
GNB3C-02	54327		GNB3T-02	60863
GNB3C-03	8830		GNB3T-03	59395
GNB3C-04	1245		GNB3T-04	61301
GNB3C-05	—		GNB3T-05	40213
GNB3C-06	—		GNB3T-06	19563
GNB3C-07	—		GNB3T-07	2692
GNB3C-08	—		GNB3T-08	640
MTHFRC-01	25461		MTHFRT-01	63825
MTHFRC-02	10030		MTHFRT-02	54577
MTHFRC-03	2625		MTHFRT-03	34217
MTHFRC-04	1333		MTHFRT-04	46260
MTHFRC-05	626		MTHFRT-05	54278
MTHFRC-06	229		MTHFRT-06	37178
MTHFRC-07	—		MTHFRT-07	6861
MTHFRC-08	—		MTHFRT-08	979

実施例 2

5

実施例 1 と同様にして、遺伝子 CYP 2C19-2 および CYP 2C19-3 のそれぞれの遺伝子多型を検出試験した。各プローブの塩基配列は、遺伝子 CYP 2C19-2 用の第 1 プローブ (CYP 2C19-2-G-01~05) は SEQ ID No. 33-37、第 2 プローブ (CYP 2C19-2-A-06~010) は SEQ ID No. 38-42、遺伝子 CYP 2C19-3 の第 1 プローブ (CYP 2C19-3-G-01~05) は SEQ ID No. 43-47、第 2 プローブ (CYP 2C19-3-A-06~010) は SEQ ID No. 48-52 である。また、SEQ ID Nos. 33-52 の各塩基配列の 5' 側には塩基配列「TTTTT」が連結されている。

これらのプローブを実施例(1)と同様にしてエポキシガラス基板に固定し、DNA マイクロアレイを作成した。なお、遺伝子 CYP 2C19-2 および CYP 2C19-3 のそれぞれのマイクロアレイ構成は図 5 の左欄に示したとおりである。すなわち、CYP 2C19-2 用アレイの場合には、①~⑤が第 1 プローブスポット列、⑥~⑩が第 2 プローブスポット列である。また、CYP 2C19-3 用アレイの

15

場合には、⑪～⑮が第 1 プローブスポット列、⑯～⑳が第 2 プローブスポット列である。

標識ポリヌクレオチドの調製、ハイブリダイゼーション、シグナル測定はそれぞれ実施例 1 と同様にして行った。

5

得られた蛍光画像は図 5 に示したとおりである。また、得られた画像シグナルを数値化した結果は表 4 (CYP 2C19-2) および表 5 (CYP 2C19-3) に示したとおりである。実施例 1 と同様に蛍光シグナル比 (第 1/第 2) を算出し、蛍光シグナル比が >5 の時はホモ接合型第 1 多型形態、 <0.2 の時はホモ接合型第 2 多型形態、 0.2 以上 5 以下の時はヘテロ接合性多型形態と判定したところ、事実と一致したことが確認された。

10

表 4

Major						
	プローブ名	シグナル値		プローブ名	シグナル値	シグナル比
①	CYP 2C19-2-G-01	64465	⑥	CYP 2C19-2-A-06	64895	1.0
②	CYP 2C19-2-G-02	64984	⑦	CYP 2C19-2-A-07	65023	1.0
③	CYP 2C19-2-G-03	64690	⑧	CYP 2C19-2-A-08	39170	1.7
④	CYP 2C19-2-G-04	65309	⑨	CYP 2C19-2-A-09	13075	5.0
⑤	CYP 2C19-2-G-05	65060	⑩	CYP 2C19-2-A-10	8229	7.9
Hetero						
	プローブ名	シグナル値		プローブ名	シグナル値	シグナル比
①	CYP 2C19-2-G-01	65303	⑥	CYP 2C19-2-A-06	64989	1.0
②	CYP 2C19-2-G-02	64907	⑦	CYP 2C19-2-A-07	64656	1.0
③	CYP 2C19-2-G-03	43602	⑧	CYP 2C19-2-A-08	65083	0.7
④	CYP 2C19-2-G-04	48739	⑨	CYP 2C19-2-A-09	65040	0.7
⑤	CYP 2C19-2-G-05	18641	⑩	CYP 2C19-2-A-10	64823	0.3
Minor						
	プローブ名	シグナル値		プローブ名	シグナル値	シグナル比
①	CYP 2C19-2-G-01	10371	⑥	CYP 2C19-2-A-06	64764	0.2
②	CYP 2C19-2-G-02	8176	⑦	CYP 2C19-2-A-07	64869	0.1
③	CYP 2C19-2-G-03	-	⑧	CYP 2C19-2-A-08	64914	0
④	CYP 2C19-2-G-04	-	⑨	CYP 2C19-2-A-09	64990	0
⑤	CYP 2C19-2-G-05	-	⑩	CYP 2C19-2-A-10	65147	0

表 5

Major						
	プローブ名	シグナル値		プローブ名	シグナル値	シグナル比
⑪	CYP 2C19-3-G-01	28025	⑮	CYP 2C19-3-A-06	23936	1.2
⑫	CYP 2C19-3-G-02	20753	⑯	CYP 2C19-3-A-07	25290	0.8
⑬	CYP 2C19-3-G-03	19070	⑰	CYP 2C19-3-A-08	13678	1.4
⑭	CYP 2C19-3-G-04	23035	⑱	CYP 2C19-3-A-09	8593	2.7
⑮	CYP 2C19-3-G-05	27720	⑳	CYP 2C19-3-A-10	2952	9.4
Hetero						
	プローブ名	シグナル値		プローブ名	シグナル値	シグナル比
⑪	CYP 2C19-3-G-01	46011	⑮	CYP 2C19-3-A-06	44044	1.0
⑫	CYP 2C19-3-G-02	31691	⑯	CYP 2C19-3-A-07	47014	0.5
⑬	CYP 2C19-3-G-03	34519	⑰	CYP 2C19-3-A-08	28242	0.5
⑭	CYP 2C19-3-G-04	32234	⑱	CYP 2C19-3-A-09	24735	1.3
⑮	CYP 2C19-3-G-05	24581	⑳	CYP 2C19-3-A-10	24134	1.0
Minor						
	プローブ名	シグナル値		プローブ名	シグナル値	シグナル比
⑪	CYP 2C19-3-G-01	-	⑮	CYP 2C19-3-A-06	49587	0
⑫	CYP 2C19-3-G-02	-	⑯	CYP 2C19-3-A-07	47108	0
⑬	CYP 2C19-3-G-03	-	⑰	CYP 2C19-3-A-08	18297	0
⑭	CYP 2C19-3-G-04	-	⑱	CYP 2C19-3-A-09	9378	0
⑮	CYP 2C19-3-G-05	-	⑳	CYP 2C19-3-A-10	8602	0

5

産業上の利用可能性

10

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明は、より正確な SNP 検出を可能とする DNA アレイと、この DNA アレイを用いて正確な SNP 検出を行う方法に関するものである。またこの出願の発明は、SNP 検出の対象となる遺伝子に応じた適切なプローブ長を決定する方法と、この方法により決定されたプローブ長からなるプローブを備えた DNA アレイに関するものである。これらの発明によって、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子の探索、あるいはテーラーメイド医療のための重要な遺伝子情報としての SNP を正確かつ再現性よく検出することが可能となる。

請求の範囲

1. 遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子
5 ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正
確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同配
列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからな
る第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第 1 プローブスポット群と
第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブス
10 ポット毎にプローブの長さが異なる、ことを特徴とする DNA アレイ。
2. 第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群は、それぞれ、2
～10 のプローブスポットからなる請求項 1 の DNA アレイ。
- 15 3. 2～10 のプローブスポットが、そのプローブの長さの順に配置され
ている請求項 2 の DNA アレイ。
4. 請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを少なくとも含む、遺伝子
の一塩基多型を検出するためのキット。
- 20 5. 請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多
型を検出する方法であって、以下のステップ：
(a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；
(b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ；
25 (c) DNA アレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより
得られるシグナルを測定するステップ；
を含むことを特徴とする一塩基多型の検出方法。
6. 前記ステップ(c)において測定された、前記第 1 のプローブスポット
30 群と前記第 2 のプローブスポット群のそれぞれのシグナルを比較する請求項 5 の

一塩基多型の検出方法。

7. 請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを用いて、遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法であって、以下のステップ :
- 5 (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ ;
- (b) 標識ポリヌクレオチドを DNA アレイに接触させるステップ ;
- (c) DNA アレイ上の各プローブに結合した標識ポリヌクレオチドの標識シグナルを測定し、
- 10 以下の基準 :
- (i) 被験遺伝子がホモ接合性第 1 多型形態の場合に第 1 のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
- (ii) 被験遺伝子がホモ接合性第 2 多型形態の場合に第 2 のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
- 15 (iii) 被験遺伝子がヘテロ接合性多型形態の場合に第 1 のプローブスポット群と第 2 のプローブスポット群とに同程度の標識シグナルが観察されること、
- を満たすプローブスポットのプローブ長を、その遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長と決定することを特徴とする方法。
- 20 8. 遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポットと、同配列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポットとを固相基体上に有し、第 1 および第 2 のプローブスポットを構成するプローブ長が、請求項 7 の方法で決定された長さである DNA アレイ。
- 25

1/5

図 1

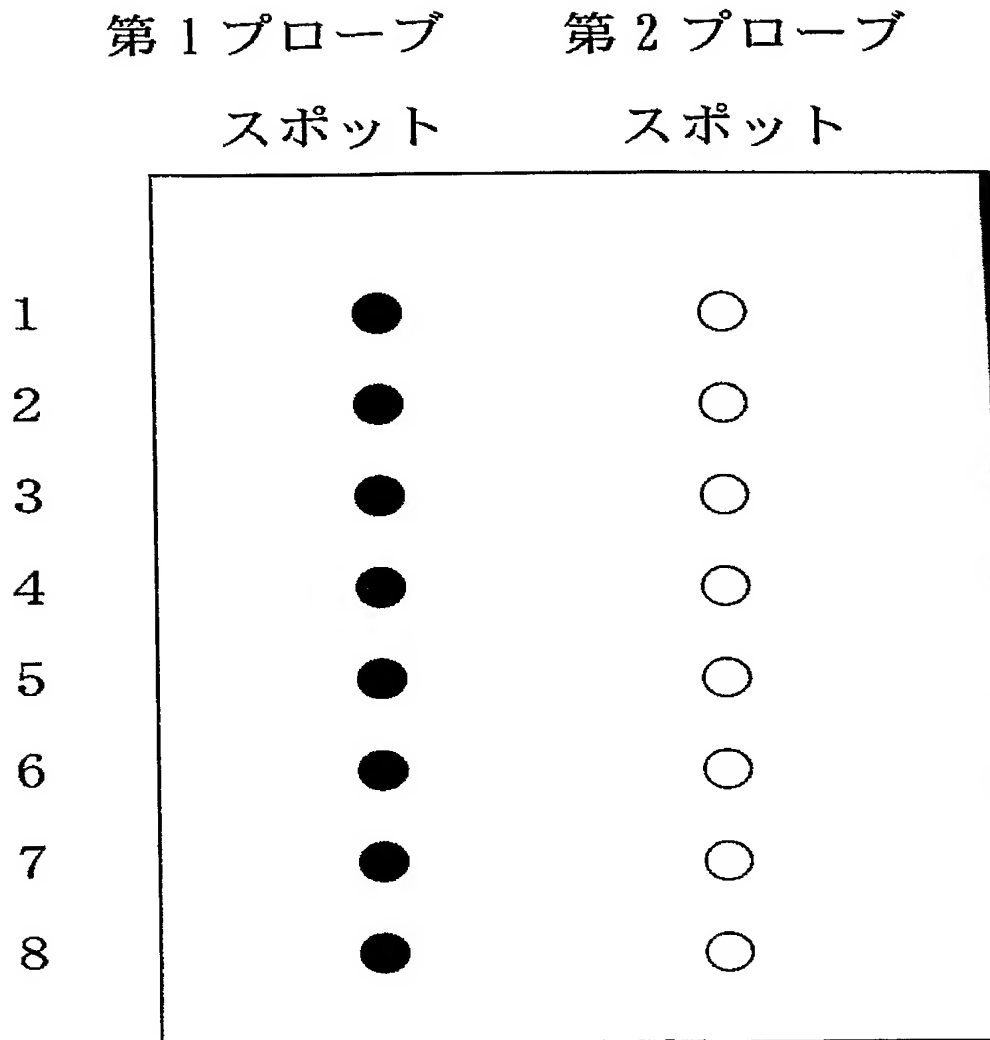
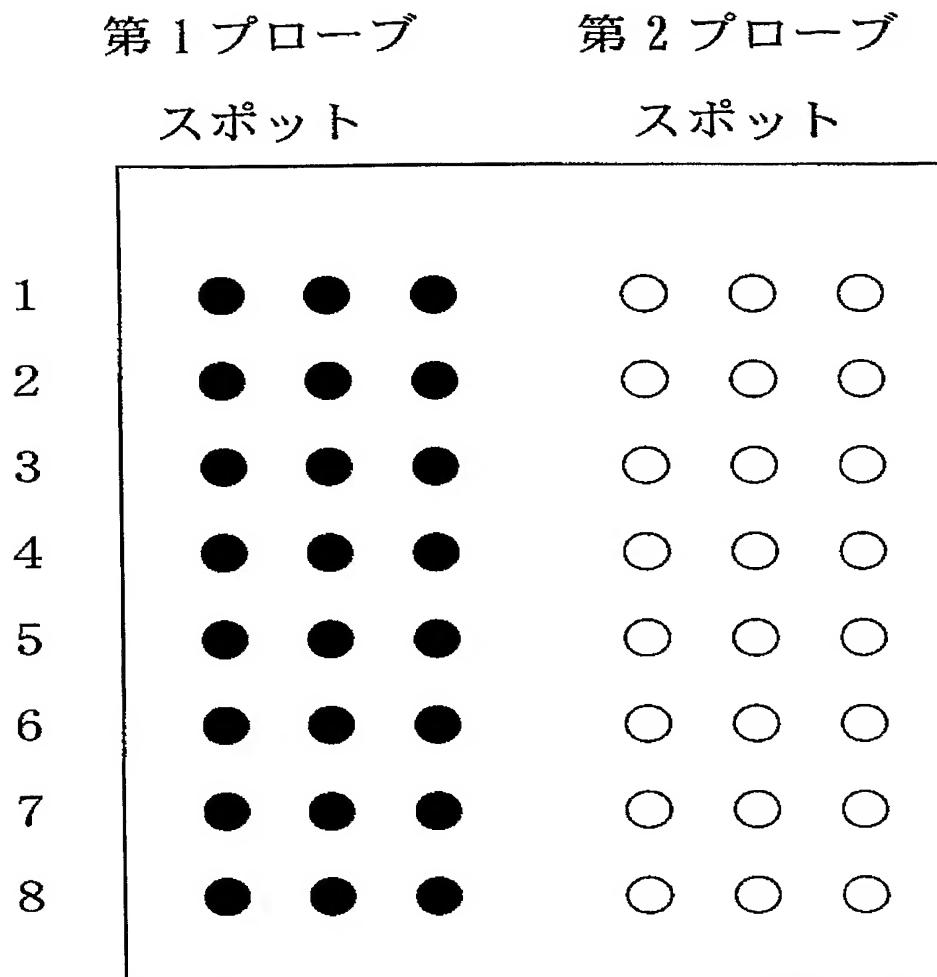
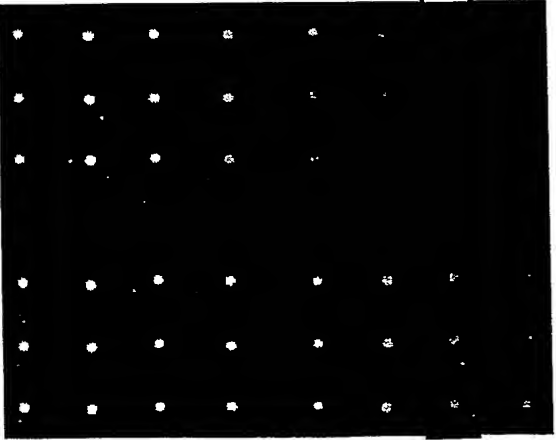
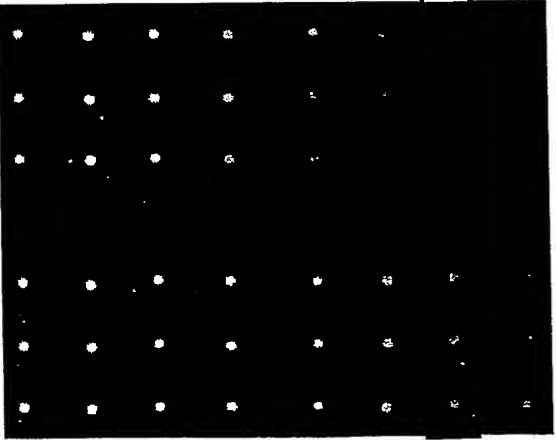
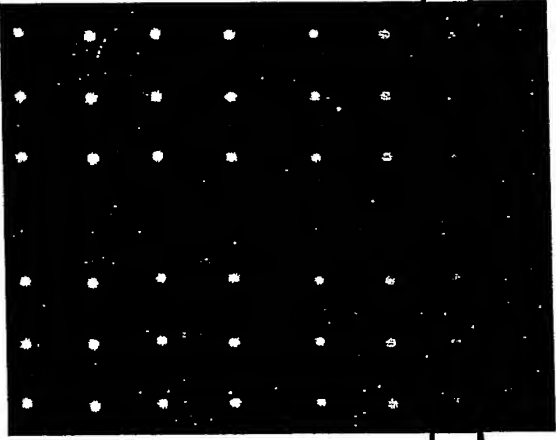
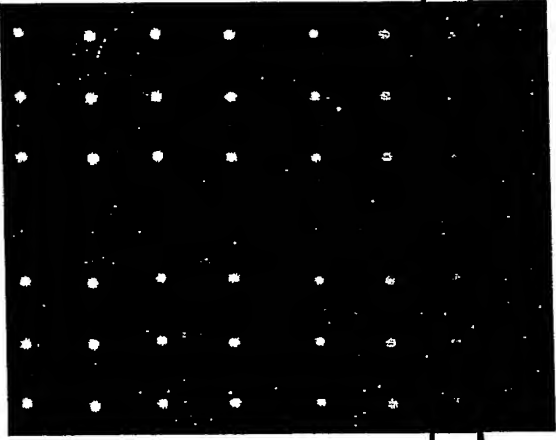
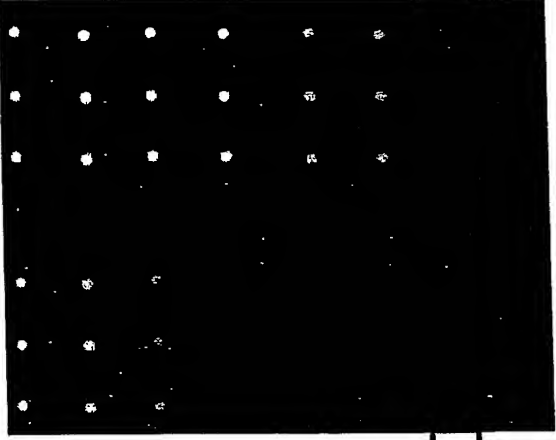
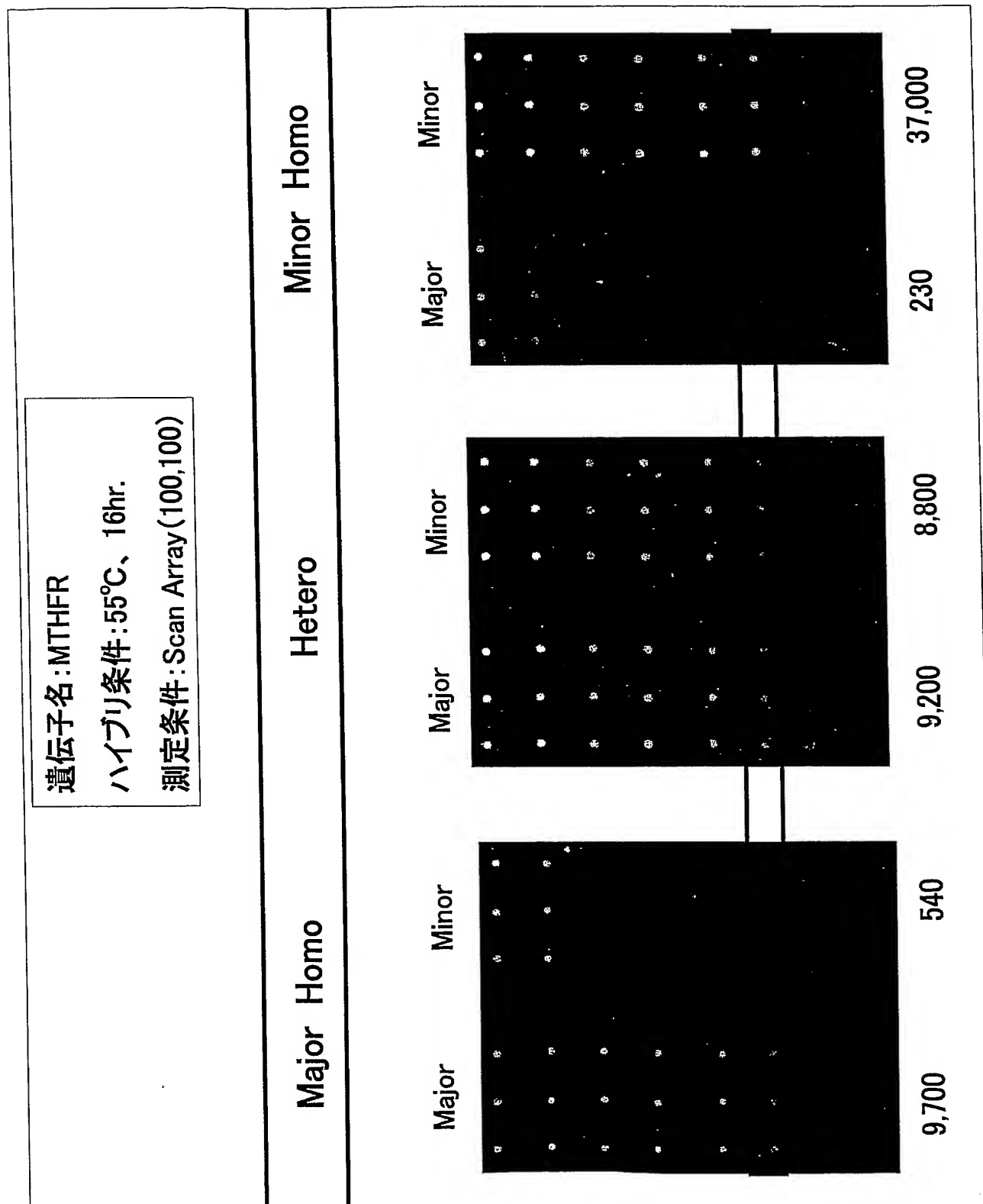


図 2



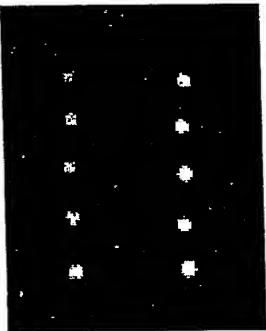
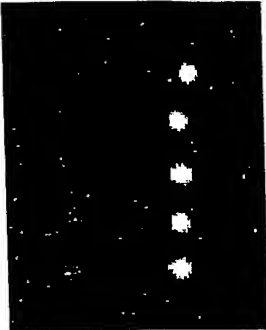
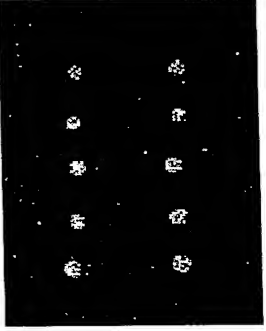
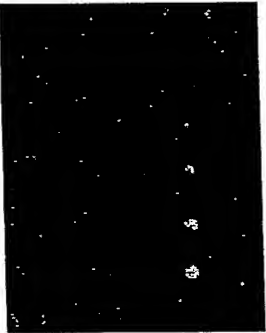
☒ 3

<div> 遺伝子名: GNB3 ハイブリ条件: 55°C、16hr. 測定条件: Scan Array (100,100) </div>				
Major Homo		Hetero		Minor Homo
Major	Minor	Major	Minor	Major
				
11,000	290	6,000	8,500	2,700



5/5

☒ 5

遺伝子名	Major	Hetero	Minor
CYP 2C19-2	Major probe		
Minor probe	<div data-bbox="610 1688 737 1923"> ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ </div>	 18641 64823	 45 65147
CYP 2C19-3	Major probe		
Minor probe	<div data-bbox="1195 1688 1321 1923"> ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱ ⑲ ㉔ </div>	 24581 24134	 0 49587

SEQUENCE LISTING

<110> TOYOB0 Co., Ltd.
NGK Insulators, Ltd.

<120> DNA Array and Method for Detecting Single Nucleotide Polymorphism

<130> 05-F-013PCT

<150> JP2004-81034

<151> 2004-03-19

<160> 52

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

GGCATCACGT CCGTGGCCTT CTCCC

25

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

GCATCACGTC CGTGGCCTTC TCCC

24

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

2/15

<400> 3
GCATCACGTC CGTGGCCTTC TCC 23

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4
CATCACGTCC GTGGCCTTCT CC 22

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5
CATCACGTCC GTGGCCTTCT C 21

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6
ATCACGTCCG TGGCCTTCTC 20

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

3/15

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ATCACGTCCG TGGCCTTCT

19

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8

TCACGTCCGT GGCCTTCT

18

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 9

GGCATCACGT CTGTGGCCTT CTCCC

25

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 10

GCATCACGTC TGTGGCCTTC TCCC

24

<210> 11

4/15

<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 11

GCATCACGTC TGTGGCCTTC TCC

23

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 12

CATCACGTCT GTGGCCTTCT CC

22

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 13

CATCACGTCT GTGGCCTTCT C

21

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 14

ATCACGTCTG TGGCCTTCTC

20

5/15

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 15
ATCACGTCTG TGGCCTTCT 19

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 16
TCACGTCTGT GGCCTTCT 18

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 17
GTCTGCGGGA GCCGATTCA TCATC 25

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

6/15

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 18

GTCTGCGGGA GCCGATTCA TCAT 24

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 19

TCTGCGGGAG CCGATTTCAT CAT 23

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 20

TCTGCGGGAG CCGATTTCAT CA 22

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 21

CTGCGGGAGC CGATTTCATC A 21

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

7/15

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 22

CTGCGGGAGC CGATTTCATC

20

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 23

TGCGGGAGCC GATTTCATC

19

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 24

TGCGGGAGCC GATTTCAT

18

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 25

GTCTGCGGGA GTCGATTCA TCATC

25

8/15

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 26
GTCTGCGGGA GTCGATTTCAT TCAT 24

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 27
TCTGCGGGAG TCGATTTCAT CAT 23

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 28
TCTGCGGGAG TCGATTTCAT CA 22

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 29

9/15

CTGCGGGAGT CGATTTCATC A

21

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 30

CTGCGGGAGT CGATTTCATC

20

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 31

TGCGGGAGTC GATTTCATC

19

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 32

TGCGGGAGTC GATTTCAT

18

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10/15

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 33

TTTTTTTGAT TATTCCCGG GAACCCATAA CA 32

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 34

TTTTTTGATT ATTTCCCGGG AACCCATAAC A 31

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 35

TTTTTTGATT ATTTCCCGGG AACCCATAAC 30

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 36

TTTTTGATTA TTCCCGGGA ACCCATAAC 29

<210> 37

<211> 28

<212> DNA

11/15

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 37

TTTTTGATTA TTTCCCGGGA ACCCATAA 28

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 38

TTTTTATTGA TTATTTCCCA GGAACCCATA ACAA 35

<210> 39

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 39

TTTTTATTGA TTATTTCCCA GGAACCCATA ACAA 34

<210> 40

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 40

TTTTTTTGAT TATTTCCCAG GAACCCATAA CAA 33

12/15

<210> 41
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 41
TTTTTTTGAT TATTTCCCAG GAACCCATAA CA 32

<210> 42
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 42
TTTTTTGATT ATTTCCCAGG AACCCATAAC A 31

<210> 43
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 43
TTTTTATCAG GATTGTAAGC ACCCCCTGGA TCCA 34

<210> 44
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 44

TTTTTTCAGG ATTGTAAGCA CCCCTGGAT CCA 33

<210> 45
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 45
TTTTTTCAGGA TTGTAAGCAC CCCCTGGATC CA 32

<210> 46
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 46
TTTTTAGGAT TGTAAGCACC CCCTGGATCC A 31

<210> 47
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 47
TTTTTGGATT GTAAGCACCC CCTGGATCCA 30

<210> 48
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

14/15

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 48

TTTTTCATCA GGATTGTAAG CACCCCCTGA ATCCA

35

<210> 49

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 49

TTTTTATCAG GATTGTAAGC ACCCCCTGAA TCCA

34

<210> 50

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 50

TTTTTTCAGG ATTGTAAGCA CCCCCTGAAT CCA

33

<210> 51

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 51

TTTTTCAGGA TTGTAAGCAC CCCCTGAATC CA

32

<210> 52

<211> 31

<212> DNA

15/15

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 52

TTTTTAGGAT TGTAAGCACC CCCTGAATCC A

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-514091 A (Affymetrix, Inc.), 14 May, 2002 (14.05.02), Claims & US 6368799 B1 & EP 1009857 A & WO 98/56954 A1	1-8
A	JP 2003-505038 A (ROSETTA INPHARMATICS, INC.), 12 February, 2003 (12.02.03), Description as a whole & EP 1200625 A & WO 01/6013 A1	1-8
A	ARMSTRONG B. et al., "Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping.", Cytometry., 2000, Vol.40, No.2, p.102-8.	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 April, 2005 (15.04.05)

Date of mailing of the international search report
10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST ファイル(JOIS) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN) CAPLUS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-514091 A(アフィニティックス, インコーポレイテッド) 2002. 05. 14, CLAIMS & US 6368799 B1 & EP 1009857 A & WO 98/56954 A1	1-8
A	JP 2003-505038 A(ロゼッタ・インファーマティクス・インコーポレイテッド) 2003. 02. 12 明細書全体 & EP 1200625 A & WO 01/6013 A1	1-8
A	ARMSTRONG B, et. al., " Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping." Cytometry., 2000, Vol. 40, No. 2, p. 102-8.	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 04. 2005

国際調査報告の発送日

10. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4N

9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488